

INFORMES TÉCNICOS

INSTITUTO ESPAÑOL
DE OCEANOGRAFÍA

ISSN: 0212-1565

RESULTADOS PRELIMINARES DE FERTILIZACIONES ARTIFICIALES REALIZADAS CON ESPERMA CRIOCONSERVADO DE RODABALLO *SCOPHTHALMUS MAXIMUS* (LINNAEUS, 1758)

J. B. Peleteiro¹
O. Chereguini²
y R. M. Cal¹

¹ Planta de Cultivos de Vigo.
INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFÍA
Apartado 1552. 36280 Vigo (Pontevedra), España

² Planta de Cultivos de Santander.
INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFÍA
Apartado 240. 39080 Santander, España

Recibido en enero de 1996. Aceptado en marzo de 1996
Coordinación científica editorial: José Iglesias Estévez



MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION

SECRETARÍA GENERAL TÉCNICA

Centro de Publicaciones
Paseo de la Infanta Isabel, 1. 28014 Madrid, España

Núm. 162
Págs. 13
Madrid, España 1996

RESULTADOS PRELIMINARES DE FERTILIZACIONES ARTIFICIALES REALIZADAS
CON ESPERMA CRIOCONSERVADO DE RODABALLO *SCOPHTHALMUS MAXIMUS*
(LINNAEUS, 1758)*

J. B. Peleteiro¹, O. Chereguini² y R. M. Cal¹

¹Planta de Cultivos de Vigo. Instituto Español de Oceanografía. Apartado 1552. 36280 Vigo (Pontevedra), España.

²Planta de Cultivos de Santander. Instituto Español de Oceanografía. Apartado 240. 39080 Santander, España.

RESUMEN

Se crioconservó una mezcla de esperma procedente de cuatro machos sometidos a control de fotoperíodo. Después de valorar individualmente el esperma, la mezcla fue homogeneizada y preparada para la crioconservación.

Se utilizaron dos diluyentes diferentes: la solución salina modificada de Ringer y la solución de Mounib, a los que se añadió como crioprotectores un 10 % de yema de huevo y un 10 % de dimetil sulfoxido (DMSO). Las relaciones esperma-diluyente utilizadas fueron 1:2 y 1:3. Una vez congelado en nitrógeno líquido a -196 °C, se mantuvo durante 24 horas, período tras el cual fue descongelado y utilizado en la fecundación artificial.

Las tasas de fecundación (85-92 %) y de eclosión (23-35 %) obtenidas con esperma crioconservado no difieren significativamente para los dos diluyentes ni para las dos diluciones ($p < 0,001$).

Palabras clave: Rodaballo, esperma, crioconservación, diluyente, crioprotector.

ABSTRACT

Preliminary results of artificial fertilization carried out with cryopreserved sperm of turbot *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758)

A sperm pool from four males subjected to photoperiod monitoring was cryopreserved. Following individual evaluation of the sperm, the mixture was homogenised and prepared for cryopreservation.

Two different diluents were used: modified Ringer saline solution and Mounib solution to which 10 % egg yolk and 10 % dimethyl sulphoxide (DMSO) were added as cryoprotector. Sperm/diluent ratios used were 1:2 and 1:3. Sperm was maintained at -196 °C for 24 hours. After this period, the sperm was thawed and used in artificial fertilisation.

The fertilization rates (85-92 %) and hatching rates (23-35 %) obtained with cryoconserved sperm showed no significant differences for the two diluents nor for the two solutions ($p < 0,001$).

Key words: Turbot, sperm, cryoconservation, diluent, cryoprotector.

* Recibido en enero de 1996. Aceptado en marzo de 1996.

Coordinación científica editorial: José Iglesias Estévez.

1. INTRODUCCIÓN

La posibilidad de crioconservar esperma de peces marinos permite ejercer un mayor control sobre los procesos de la reproducción: disponer de esperma seleccionado en cualquier época del año, mantener un menor número de machos y facilitar la hibridación de stocks distantes entre sí geográficamente, reduciéndose el riesgo de transmisión de enfermedades y el coste de transporte (Erdahl y Graham, 1980; Munkittrick y Moccia, 1984; Stoss, 1983). Además, esta técnica es interesante para especies con desfases en la maduración gonadal (Harvey, 1982), o en peligro de extinción, y también para preservar la estructura genética de sus poblaciones naturales (Piironen, 1987; Cloud, Miller y Levanduski, 1990).

El almacenamiento de esperma a baja temperatura ha sido objeto de numerosas investigaciones: Scott y Baynes (1980); Stoss (1983); Leung y Jamieson (1991); McAndrew, Rana y Penman (1993); Rana (1993), lo que ha permitido la puesta a punto de técnicas de crioconservación. Las primeras experiencias de crioconservación de esperma con peces planos fueron descritas por Pullin (1972), con platija (*Pleuronectes platessa* L., 1758), y Billard y Dupond (1975) y Billard y Breton (1976), con rodaballo *Scophthalmus maximus* (L., 1758). Actualmente, se dispone de información con buenos resultados acerca de la crioconservación de esperma de peces marinos de interés comercial (Bolla, Holmefjord y Refstie, 1977; Chambeyron y Zohar, 1990).

La capacidad de fertilización del esperma, tras un proceso de congelación-descongelación, depende de factores relativos a la especie, y de otros relativos a la propia técnica: tipo de diluyente y crioprotector utilizados, relación esperma-diluyente y velocidad de congelación-descongelación. Respecto a la calidad del esperma fresco o congelado e independientemente de los diversos criterios que se barajen, el mejor y definitivo es la capacidad de fertilización y el óptimo desarrollo embrionario hasta la eclosión (Koldras y Bieniarz, 1987). Existe mucha información respecto a éxitos en crioconservación y tasas de fertilización, pero en su mayoría no aporta datos en cuanto a su posterior desarrollo embrionario.

En el presente trabajo se presentan los resultados de tasas de fecundación y eclosión obtenidos en fecundaciones de rodaballo, utilizando esperma crioconservado en dos diluyentes diferentes.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

La realización de esta experiencia se llevó a cabo en dos etapas. En la primera se crioconservó esperma con diferentes diluyentes según la técnica descrita por Chereguini, Fernández-Pato y Rasines (1992), y en la segunda se realizaron series de fecundaciones con dicho esperma crioconservado.

2.1 Primera etapa: crioconservación de esperma

Se seleccionaron cuatro machos (peso medio 3 200 g) de un stock de reproductores de rodaballo sometido a control de fotoperíodo (16 horas de luz y 8 de oscuridad). El esperma fue extraído por presión abdominal mediante jeringuillas de 1 ml, evitándose la contaminación con orina y manteniéndose a baja temperatura hasta la valoración, en movilidad y concentración, de cada muestra. La movilidad del esperma se valoró mediante observación microscópica tras ser activado con agua de mar al 20 ‰, según la escala de Sánchez-Rodríguez (1975), que consiste en valorar la movilidad en una escala de 0 a 5. La concentración de espermatozoides se determinó por conteo directo al microscopio en la cámara de Thoma tras dilución de la muestra de esperma con formol al 1 %.

Posteriormente, con las cuatro muestras de esperma extraídas se elaboró una mezcla, que se homogeneizó y repartió en alícuotas para ser crioconservada. Los diluyentes empleados en la crioconservación fueron la solución salina modificada de Ringer y la solución de Mounib (tabla I). A dichos diluyentes se les añadió un 10 % de DMSO (dimetil sulfóxido) y un 10 % de yema de huevo como crioprotectores. La relación esperma-diluyente fue 1:2 y 1:3 en las series A y B, respectivamente.

Una vez preparadas, las diferentes diluciones fueron introducidas en pajuelas de plástico de 0,5 ml, que se sellaron con alcohol polivinílico. A continuación se introdujeron en un contenedor de nitrógeno líquido (BT-21) manteniéndose a unos centímetros de la superficie del líquido por un espacio de 7 minutos, tras el cual fueron sumergidas en el mismo a -196 °C.

2.2 Segunda etapa: fecundaciones

Las pajuelas con el esperma crioconservado fueron extraídas del contenedor de nitrógeno líquido después de 24 horas y se descongelaron en baño de agua a 34 °C durante unos segundos.

Previamente habían sido extraídos por presión abdominal los ovocitos de una hembra (peso = 5 400 g, talla = 62 cm) del mismo stock de reproductores. Estos ovocitos se repartieron en lotes de 10 cm³ (aproximadamente 9 000 huevos/lote) para cada una de las cuatro réplicas. Se realizaron dos series de fecundaciones, utilizando en todos los casos la misma cantidad de huevos.

La serie A se realizó con esperma crioconservado con dos diluyentes distintos: la solución salina de Ringer (CR) y la solución de Mounib (CM). La relación esperma-diluyente fue 1:2, utilizándose dosis de esperma de 166 microlitros.

La serie B se realizó en las mismas condiciones que la serie A, pero la relación esperma-diluyente fue de 1:3, y las dosis de esperma empleadas fueron de 125 microlitros.

Ambas fecundaciones se realizaron en seco, y transcurridos veinte minutos se añadió agua de mar filtrada por 1 µm a 14 °C hasta completar dos litros. A las 2 horas, se separó el huevo no flotante del flotante y se calculó el porcentaje de fecundación en relación al huevo flotante. Se continuó con su incubación a $14 \pm 0,5$ °C hasta la eclosión.

Diariamente, se retiró el huevo no flotante del fondo y se renovó el agua en un 50 %. Tras 70 °C-día (5 días), los huevos eclosionaron y se calculó la tasa de eclosión con respecto al número de huevos fecundados.

Los resultados con cada uno de los diluyentes fueron comparados utilizándose un análisis de varianza de dos factores ($p < 0,001$).

3. RESULTADOS

3.1 Valoración de esperma

Los valores de concentración y movilidad de esperma se exponen en la tabla II. Se observa que las concentraciones individuales de esperma varían entre $2,0 - 6,2 \times 10^9$ espermatozoides/ml y que la concentración de la mezcla fue de $3,17 \times 10^9$ espermatozoides/ml.

La movilidad del esperma tras la activación fue de 4, a excepción del macho n.º 2, que presentó 3, y la movilidad de la mezcla de esperma fue de 4 (tabla II).

3.2 Tasas de fecundación

Los valores de las tasas de fecundación obtenidos con esperma crioconservado en diferentes diluyentes se exponen en la figura 1a. En la serie A con relación esperma-diluyente (relación 1:2), se puede observar que los valores más altos corresponden a las fecundaciones realizadas con esperma crioconservado en solución salina de Ringer (92,45 %), mientras que en el crioconservado en la solución de Mounib se obtuvieron valores del 84,79 %. La relación del número de espermatozoides por ovocito utilizada en las fecundaciones realizadas de esta serie fue de 58468 espermatozoides/ovocito.

En la serie B, con relación esperma-diluyente (relación 1:3), los resultados fueron también altos, obteniéndose tasas de fecundación del 84,01 % y del 90,29 % con esperma crioconservado en solución salina de Ringer y en solución de Mounib, respectivamente.

La relación del número de espermatozoides por ovocito utilizada en las fecundaciones de esta serie fue de 44027 espermatozoides/ovocito.

3.3 Tasas de eclosión

Las tasas de eclosión obtenidas con esperma crioconservado en los dos diluyentes se muestran en la figura 1b. Las tasas obtenidas con las soluciones salinas de Ringer y Mounib fueron muy semejantes en ambas series (± 35 %), a excepción del valor de eclosión correspondiente a la experiencia realizada con esperma crioconservado en solución salina de Ringer cuando la relación esperma-diluyente era de 1:2 (22,86 %).

En estas experiencias, los huevos fertilizados con esperma crioconservado se desarrollaron normalmente y después de cinco días de incubación, eclosionaron sin presentar ninguna alteración.

Al comparar estadísticamente tanto las tasas de fecundación como las de eclosión obtenidas con esperma crioconservado, no se han encontrado diferencias significativas ni para los dos diluyentes ni para las dos disoluciones ($p < 0,001$).

4. DISCUSIÓN

En cuanto a la concentración, las valoraciones del esperma fresco obtenidas en este trabajo fueron $2,0 - 6,2 \times 10^9$ espermatozoides/ml,

semejantes a las obtenidas por Fauvel et al. (1992, 1993) (entre 0,7 y 11,0 x 10⁹ espermatozoides/ml) y a las registradas por Suquet et al. (1992) (3,8 ± 0,6 x 10⁹ espermatozoides/ml), utilizando las mismas técnicas.

Las tasas de fecundación y eclosión obtenidas con espermatozoides criopreservados en diluyente Mounib o solución salina de Ringer fueron semejantes a las obtenidas con espermatozoides frescos para esta especie por otros autores: Peleteiro, Rodríguez-Ojea e Iglesias (1993); Fauvel et al. (1992, 1993); Ommes et al. (1991).

El desarrollo embrionario transcurrió normalmente hasta la eclosión, no detectándose el incremento de mortalidad registrado por Koldras y Bieniarz (1987) tras las 20 horas posteriores a la fecundación de ovocitos de carpa (*Cyprinus carpio* L., 1758) con espermatozoides criopreservados.

Los resultados obtenidos en ésta experiencia demuestran que, al igual que en otras especies de peces, el espermatozoides de rodaballo criopreservado según el protocolo utilizado en este experimento y utilizando los dos diluyentes es perfectamente válido, habiéndose obtenido tasas de fecundación y eclosión muy similares a las logradas con espermatozoides frescos. No obstante, es necesario continuar estudiando el fluido seminal para formular un diluyente específico para la criopreservación del espermatozoides de rodaballo y determinar la dosis de espermatozoides criopreservado/ovocito óptima.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Billard, R. y B. Breton. 1976. Sur quelques problèmes de physiologie du sperme chez poissons teleostéens. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 40: 501-503.
- Billard, R. y J. Dupond. 1975. Études sur la congélation du sperme de poissons marins (bar, daurade, turbot). *Rapport Science Contract d'activité CNEO*: 15 pp.
- Bolla, S., I. Holmefjord y T. Refstie. 1987. Cryogenic Preservation of Atlantic Halibut sperm. *Aquaculture* 65: 371-374.
- Chambeyron, F. y Y. Zohar. 1990. A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 90: 345-352.
- Choreguini, O., C. Fernández-Pato e I. Rasines. 1992. Adaptación de la técnica de criopreservación de espermatozoides para el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y besugo (*Pagellus bogaraveo*). *Inf. Téc. Inst. Esp. Oceanogr.* 117: 13 pp.

- Cloud, J. G., W. H. Miller y M. J. Levanduski. 1990. Cryopreservation of Sperm as a Means to Secure Salmonid Germ Plasm and to Transfer Genes from Wild Fish to Hatchery Populations. *Progressive Fish-Culturist* 52: 51-53.
- Erdahl, D. A. y E. F. Graham. 1980. Preservation of gametes of freshwater fish. En: *Proceeding of the 9th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*. RT-H-2: 317-326.
- Fauvel, C., M. E. Omnes, C. Mugnier, Y. Normand, G. Dorange y M. Suquet. 1993. La reproduction du turbot. Aspects biologiques et gestion des reproducteurs. *La pisciculture française* 112: 23-39.
- Fauvel, C., M. E. Omnes, M. Suquet e Y. Normand. 1992. Enhancement of the reproduction of turbot, *Scophthalmus maximus* L., larvae by controlling overripening in mature females. *Aquaculture and Fisheries Management* 23: 209-216.
- Harvey, B. 1982. Criobiology and storage of teleost gametes. En: *Proceedings of the International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Pudoc. Wageningen. C. J. J. Richter and H. J. Th. Goos (compilers). De 2 a 6 de agosto, 1982. Wageningen, The Netherlands: 123-127.
- Koldras, M. y K. Bieniarz. 1987. Cryopreservation of carp sperm. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 34: 125-136.
- Leung, L. K. P. y B. G. M. Jamieson. 1991. Live preservation of fish gametes. En: *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. B. G. M. Jamieson (ed.): 69-245. Cambridge University Press. Cambridge.
- McAndrew, B. J., K. J. Rana y D. J. Penman. 1993. Conservation and preservation of genetic variation in aquatic organisms. En: *Recent Advances in Aquaculture*. J. F. Muir y R. J. Roberts (eds.): 295-336. Blackwell Science. Oxford.
- Munkittrick, K. R. y R. D. Moccia. 1984. Advances in the cryopreservation of salmonid semen and suitability for a production-scale artificial fertilization program. *Theriogenology* 21: 645-659.
- Omnes, M. E., Y. Normand, M. Suquet y C. Fauvel. 1991. Analysis of turbot (*Scophthalmus maximus* R.) broodstock pilot scale production. *European Aquaculture Society Special Publication* 14: 245-246.
- Peleteiro, J. B., G. Rodríguez-Ojea y J. Iglesias. 1995. Individual spawning control in different turbot (*Scophthalmus maximus* L.) broodstocks under artificial and natural photoperiod. *ICES Marine Science Symposium* 201: 202-203.
- Piironen, J. 1987. Factors affecting fertilization rate with cryopreserved sperm of whitefish (*Coregonus muksun* Pallas). *Aquaculture* 66: 347-357.
- Puillin, R. V. S. 1972. The storage of plaice (*Pleuronectes platessa*) sperm at low temperatures. *Aquaculture* 1: 273-283.

- Rana, K. J. 1993. Cryopreservation of fish spermatozoa. En: *Workshop Proceeding Genetics in Aquaculture and Fisheries Management* (31 de agosto - 4 de septiembre, 1992. University of Stirling). Stirling, C. K., D. Penman et al. (eds.): 49-53.
- Sánchez-Rodríguez, M. 1975. Contribución á l'étude de l'insemination artificielle de la truite (*Salmo gairdneri*); les possibilités de manipulation des gamètes et de conservation du sperme. DEA Physiologie de la Reproduction., Université de Paris VI.
- Scott, A. P., S. M. Baynes. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish. Biol.* 17: 707-739.
- Stoss, J. 1983. Fish Gamete preservation and spermatozoan physiology. En: *Fish Physiology*. W. S. Hoar, D. J. Randall y E. M. Donaldson (eds.) 9B: 305-351. Academic Press. New York.
- Suquet, M., M. H. Omnes, Y. Normand y C. Fauvel. 1992. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 101: 177-185.

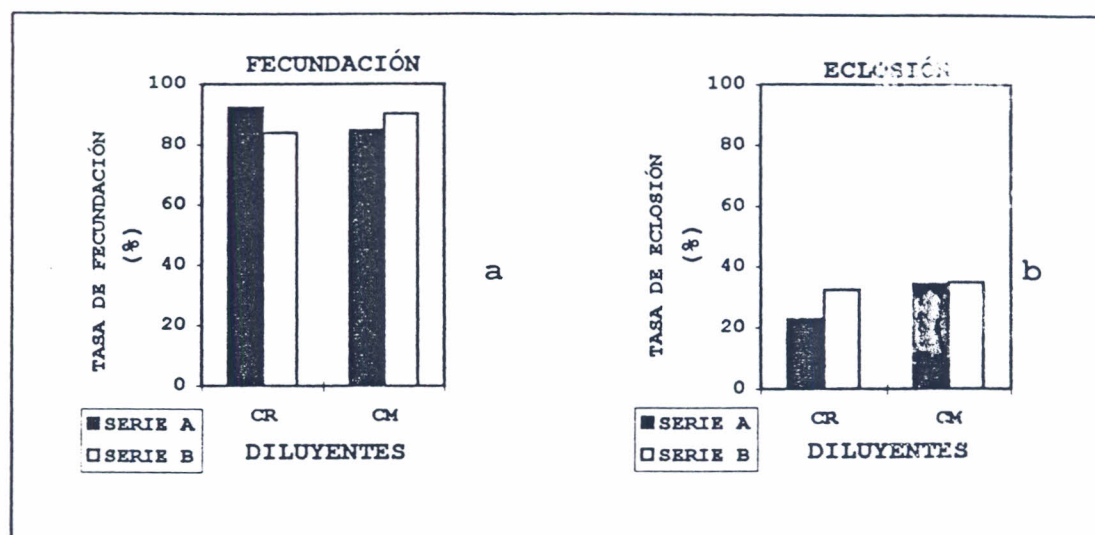


Figura 1. Tasas de fecundación (a) y eclosión (b) obtenidas con espermia crioconservado en diferentes diluyentes (soluciones Ringer y Mounib). Relación espermia-diluyente 1:2 (serie A) y 1:3 (serie B).

Tabla I. Composición de diluyentes.

SOLUCIÓN DE RINGER	
MODIFICADA	
CLORURO SÓDICO	6,5 g/l
CLORURO POTÁSICO	3,0 g/l
BICARBONATO SÓDICO	0,2 g/l
CLORURO CÁLCICO	0,3 g/l
AGUA DESTILADA	900 ml
pH = 8,06	
DMSO	100 ml (al 10 %)
YEMA DE HUEVO (opcional)	100 ml (al 10 %)

SOLUCIÓN DE MOUNIB	
MODIFICADA POR LEGENDRE Y BILLARD	
SACAROSA	125 mM = 42,7875 g/l
GLUTATIÓN REDUCIDO	6,5 mM = 1,9976 g/l
BICARBONATO POTÁSICO	100 mM = 10,0120 g/l
AGUA DESTILADA	900 ml
pH = 7,57	
DMSO	100 ml (al 10 %)
YEMA DE HUEVO (opcional)	100 ml (al 10 %)

Tabla II. Densidad y movilidad del esperma de cada ejemplar y de la mezcla congelada.

ESPERMA	MACHO n.º1	MACHO n.º2	MACHO n.º3	MACHO n.º4	MEZCLA CONGELADA
CONCENTRACIÓN (n.º espermatozoides x 10 ⁹ /ml)	2,75	2,00	2,28	6,20	3,17
MOVILIDAD	4	3	4	4	4